مقاله پژوهشی

اثرات ترکیب آلوم و ملاتونین بر پاسخ‌های ایمنی در موش سفید آزمایشگاهی ایمن شده با *سالمونلا تیفی موریوم* کشته‌شده

زهرا جوادی، سید میثم ابطحی فروشانی*، ملاحت احمدی

گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۶/۱۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۸/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: ملاتونین ازجمله ترکیبات ایمونومودولاتور است. هدف این پژوهش، امکان‌سنجی بهبود پاسخ‌های ایمنی، به دنبال استفاده همزمان از ملاتونین در واکسن ساخته‌شده از فرم کشته‌شده *سالمونلا تیفی موریوم* و آلوم بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی شامل ۵۰ موش سفید آزمایشگاهی نر بود که به‌طور تصادفی در ۵ گروه مساوی قرار گرفتند. موش‌ها به ترتیب با باکتری کشته‌شده (10^6 CFU)، باکتری کشته‌شده در همراهی با ادجوانت آلوم، باکتری کشته‌شده و ملاتونین (۱۰۰mg/kg)، باکتری کشته‌شده همراه با ملاتونین و ادجوانت آلوم و یا PBS به‌صورت زیر جلدی، دو بار به فاصله دو هفته ایمن شدند. نیمی از موش‌ها یک هفته بعد از آخرین ایمن‌سازی مورد ارزیابی ایمونولوژیک قرار گرفتند. نیمی دیگر از موش‌ها به‌منظور ارزیابی اثرات حفاظتی واکسن با 10^7 CFU باکتری زنده به‌صورت داخل صفاقی چالش شدند.

نتایج: واکسن ترکیبی موجب بهبود منحنی بقاء همزمان با افزایش معنی‌دار پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری و همچنین شاخص تکثیر لنفوسیتی به دنبال چالش با آنتی‌ژن باکتریایی در مقایسه با سایر گروه‌ها شد ($P<0.05$). گروه دریافت‌کننده آلوم نسبت گروه ملاتونین منجر به افزایش تیتر بیشتری در تست ویدال در ارتباط با آنتی‌ژن‌های O و H شد. البته باوجود افزایش تیتر آنتی‌بادی‌ها در تست ویدال گروه ترکیبی، تغییر یادشده نسبت به گروه آلوم تغییر معنی‌داری نبود.

نتیجه‌گیری: ترکیب ملاتونین و آلوم موجب افزایش قابل‌توجه ایمنی‌زایی و اثرات حفاظتی واکسن کشته‌شده *سالمونلا تیفی موریوم* شده است.

کلمات کلیدی: *سالمونلا تیفی موریوم*، واکسن، ادجوانت، آلوم، ملاتونین

مقدمه

سالمونلا تیفی موریوم باسیل گرم منفی و داخل سلولی اختیاری است که در جنس سالمونلا و خانواده انتروباکتریاسه قرار می‌گیرد. این باکتری عامل ایجادکننده عفونت‌های روده‌ای یا خارج روده‌ای در انسان، دام و پرندگان است. انتشار این باکتری از حیوان به حیوان دیگر و استفاده از مواد غذایی دامی آلوده به سالمونلا توجیه‌کننده این مطلب است که حیوانات به‌عنوان مخزن باکتری می‌باشند. عفونت‌های سالمونلا به‌راحتی با مصرف غذا یا آب آلوده تهیه‌شده توسط فرد آلوده به انسان منتقل می‌شوند و دارای دوز عفونی پایینی هستند که این عامل انتشار عفونت از فردی به فرد دیگر را تسهیل می‌کند. *سالمونلا تیفی موریوم* اغلب به شکل عفونت‌های روده‌ای با علائمی از قبیل اسهال یا اسهال هموراژیک روی می‌دهد. علائم بیماری ناشی از این باکتری در مدل موش، علائم حصبه در انسان را تقلید می‌کند (۱).

در ایجاد ایمنی حفاظت کننده علیه سالمونلا تحریک هر دو جزء سیستم ایمنی اختصاصی هومورال و سلولار ضروری است (۴-۲). برخلاف واکسن‌های زنده ضعیف شده واکسن‌هایی که حاوی جسم سلولی باکتری کشته‌شده می‌باشند، سطح بالایی از ایمنی حفاظت کننده را ایجاد ننموده و جهت کارایی بیشتر نیازمند همراهی در تجویز با ادجوانت‌ها هستند (۵). بااین‌حال همیشه دسترسی به چنین امری ممکن نیست. ادجوانت‌ها

*نویسنده مسئول: **سید میثم ابطحی فروشانی**، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران
Email: sm.abtahi@urmia.ac.ir
https://orcid.org/0000-0003-2579-6618

ترکیباتی هستند که به‌منظور تحریک بهتر سیستم ایمنی در جهت ایجاد پاسخ‌های مؤثرتر در برابر آنتی‌ژن‌های کشته‌شده، استفاده می‌شوند. ادجوانت آلوم تنها ادجوانتی است که توسط اداره کل غذا و داروی آمریکا اجازه استفاده در همراهی با واکسن-های انسانی را دارد. متأسفانه ادجوانت آلوم در ایجاد پاسخ‌های ایمنی به‌عنوان ادجوانت ضعیفی عمل می‌کند و تنها قادر به تقویت پاسخ‌های ایمنی هومورال است (۱) و به‌طور مثال در برانگیختن پاسخ ایمنی سلولی وابسته به Th1 که برای کنترل پاتوژن‌های داخل سلولی از قبیل سالمونلا ضروری بوده ناتوان است (۲). بنابراین مطالعه بر روی طراحی یک واکسن مؤثر برای پیشگیری از عفونت‌های ناشی از این باکتری در مدل موش می-تواند راهگشای طراحی یک واکسن موفق جهت پیشگیری و کنترل بیماری تیفوئید در انسان باشد.

ایمنی و بی‌خطر بودن یکی از پارامترهای موردنظر برای انتخاب ادجوانت مناسب به‌ویژه برای واکسن‌های انسانی است. شمار زیادی از ادجوانت‌ها برای مدل‌های حیوانی استفاده‌شده‌اند، گرچه بیشتر آن‌ها به خاطر سمیتی که دارند برای انسان غیرقابل استفاده هستند (۳).

تحقیقات نشان داده است که سیستم عصبی دارای ارتباط تنگاتنگی با سیستم ایمنی است و محیطی که توسط واسطه-گرهای عصبی فراهم می‌شود نقش مهمی در جهت‌گیری پاسخ-های ایمنی به سمت پاسخ‌های ایمنی سلولی (Th1) یا هومورال (Th2) دارد (۴). ملاتونین (إن استیل ۵ متوکسی تریپتامین)[1] یک ترکیب ایندول آمینی بوده که به‌طور گسترده‌ای در انواع اشکال حیات از قبیل باکتری‌ها، یوکاریوت‌های تک‌سلولی، بی‌مهرگان، مهره‌داران، جلبک‌ها، گیاهان، قارچ‌ها و حتی مواد غذایی مورداستفاده حیوانات یافت می‌شود (۵). در پستانداران، ملاتونین یک ترکیب ترشحی به‌وسیله غده پینه آل است که از کشف آن حدود ۴۰ سال می‌گذرد و در تنظیم برخی از اعمال فیزیولوژیک و پاتولوژیک شرکت می‌کند (۶). در برخی از آزمایش‌ها نشان داده‌شده که ملاتونین علاوه بر خاصیت هورمونی، خاصیت آنتی‌اکسیدانی را در مقابل گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن از خود بروز می‌دهد (۷). تحقیقات متعددی نشان می‌دهد که ملاتونین یک تعدیل‌کننده ایمنی[2] است که نه‌تنها از غده‌ی پینه آل بلکه به‌وسیله شبکیه، روده و سلول‌های کارآمد ایمنی یعنی سلول‌های مغز استخوان (۸) و لنفوسیت‌ها (۹) تولید می‌شود. درگذشته به‌خوبی نشان داده‌شده است که ملاتونین علیه بسیاری از بیماری‌های عفونی دارای اثرات محافظت بخش و تقویت‌کننده ایمنی است، به‌طور مثال نشان داده‌شده است که افزودن ملاتونین به محیط کشت منوسیت‌ها موجب افزایش قابلیت دفاعی این سلول‌ها در مقابله با باکتری مایکوباکتریوم شده به‌طوری‌که این سلول‌ها توان بیشتری در تحریک پاسخ‌های Th1 شده است. برخی از مطالعات نشان داده‌اند که در زمان زمستان و آغاز بهار میزان دریافت نور نسبت به سایر اوقات سال کمتر است و میزان عفونت مایکوباکتریومی نیز افزایش می‌یابد (۱۱-۹). بنابراین به‌خوبی مشخص است که تغییرات جوی و فصلی در درازمدت ممکن است بر روی قابلیت‌های پاسخ‌دهی سیستم ایمنی از طریق تغییر سطح ملاتونین مؤثر باشد. به‌عنوان یک شاهد دیگر در مورد اهمیت ملاتونین در دفاع ضد باکتریایی می‌توان به افزایش IFN-γ (سایتوکاین اصلی Th1) در حیوانات مبتلابه کلامیدیا و دریافت‌کننده ملاتونین اشاره کرد (۱۰). بر اساس نتایج مطالعات گذشته سطح خونی ملاتونین در افراد مسلول نسبت به افراد سالم به‌مراتب پایین‌تر است (۱۲). بنابراین ممکن است که افزودن ماده ملاتونین به ادجوانت آلوم به‌عنوان یک راهکار مناسب جهت تقویت پاسخ‌های ادجوانتی آلوم به‌خصوص در جهت تولید واکسن‌های کارآمد برای عفونت‌های داخل سلولی یا آنتی‌ژن توموری منجر گردد. بااین‌حال تاکنون در مورد خاصیت ادجوانتی ملاتونین تحقیق مناسبی صورت نگرفته است.

با توجه به مطالب فوق این پژوهش در راستای طراحی و ارزیابی واکسن سالمونلوز در همراهی با ترکیب ادجوانت آلوم-ملاتونین در جهت تحریک هر دو پاسخ ایمنی سلولی و هومورال علیه *سالمونلا تیفی موریوم* و دست یافتن به واکسنی مؤثر علیه عفونت‌های سالمونلا انجام می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

جامعه موردمطالعه، شامل ۵۰ سر موش سفید آزمایشگاهی نژاد NMRI با محدوده سنی ۶ تا ۸ هفته بود که از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. پس از طی زمان موردنیاز جهت تطابق (۱ هفته)، از موش‌های خریداری جهت انجام سه سری آزمایش‌های مجزا استفاده خواهد شد. ملاحظات اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی بر اساس دستورالعمل وزارت بهداشت،

[1] Melatonin(N-acetyl-5-methoxy tryptamine)

[2] Immunomodulator

درمان و آموزش پزشکی جمهوری اسلامی ایران صورت گرفت. کلیه مراحل تحقیق در کمیته اخلاق پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه با کد ۴۳۶/تد.ت/۳ مورد تائید قرار گرفت.

گروه‌بندی: موش‌ها به‌طور تصادفی در ۵ گروه به‌صورت زیر قرار گرفتند:

گروه باکتری کشته: شامل ۱۰ سر موش بود که با 10^6 CFU باکتری کشته‌شده به‌صورت زیر جلدی در حجم ۱۵۰ میکرولیتر، دو بار به فاصله دو هفته ایمن شدند.

گروه باکتری کشته + آلوم: شامل ۱۰ سر موش است که با 10^6 CFU باکتری کشته‌شده به‌صورت زیر جلدی در حجم ۱۰۰ میکرولیتر در همراهی با ادجوانت آلوم در حجم ۵۰ میکرولیتر، دو بار به فاصله دو هفته ایمن شدند.

گروه باکتری کشته + ملاتونین: شامل ۱۰ سر موش است که با 10^6 CFU باکتری کشته‌شده به‌صورت زیر جلدی در حجم ۱۰۰ میکرولیتر در همراهی با ملاتونین (۱۰۰mg/kg) در حجم ۵۰ میکرولیتر، دو بار به فاصله دو هفته ایمن شدند.

گروه باکتری کشته +آلوم + ملاتونین (گروه ترکیبی): شامل ۱۰ سر موش است که با 10^6 CFU باکتری کشته‌شده به‌صورت زیر جلدی در حجم ۵۰ میکرولیتر در همراهی با ملاتونین (۱۰۰mg/kg) در حجم ۵۰ میکرولیتر و ادجوانت آلوم در حجم ۵۰ میکرولیتر، دو بار به فاصله دو هفته ایمن شدند.

گروه PBS (سالم): شامل ۱۰ سر موش است که دو بار به فاصله دو هفته هر بار ۱۵۰ میکرولیتر PBS[3] به‌صورت زیر جلدی دریافت کردند.

تهیه باکتری کشته‌شده *سالمونلا تیفی موریوم*: پس از تهیه سوش استاندارد باکتری (ATCC 14028) در محیط بلاد آگار به مدت یک‌شب کشت داده شد. کلنی‌های باکتری برداشت‌شده و پس از ۳ بار شستشو در PBS، در ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند. بعد از طی این مرحله مرگ باکتری‌ها به‌وسیله کشت آن‌ها در محیط بلاد آگار اثبات شد. آنگاه تعداد باکتری‌ها درنهایت به شیوه نفلومتری مک فارلند در طول‌موج ۵۹۰ سنجیده شد و سوپانسون موردنظر تهیه شد.

ارزیابی‌های ایمونولوژیک: این ارزیابی بر روی ۵ موش از هر گروه انجام شد.

الف) ارزیابی واکنش‌های ازدیاد حساسیت تأخیری: دو هفته بعد از آخرین ایمن‌سازی مقدار 10^5 باکتری کشته‌شده به کف پای چپ ۵ موش از هر گروه تزریق شد. سپس میزان واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری از این رابطه سنجیده شد:

$$\text{شاخص واکنش ایمنی سلولی} = \frac{\text{مقدار تورم پای راست}-\text{مقدار تورم پای چپ}}{\text{مقدار تورم پای راست}}$$

ب) **ارزیابی ایمنی هومورال:** بعد از سنجش ایمنی سلولی از موش‌ها خون‌گیری شده و تیتر آنتی‌بادی به شیوه سرو-آگلوتیناسیون (تست ویدال) سنجیده شد.

ج) **ارزیابی شاخص تکثیر لنفوسیتی:** هم‌زمان طحال موش‌ها در شرایط استریل خارج‌شده و میزان تکثیر لنفوسیتی در پاسخ به آنتی‌ژن باکتریایی به شیوه MTT سنجیده خواهد شد (۱۲). به‌طور خلاصه ۲ هفته بعد از آغاز درمان اقدام به نخاعی کردن موش‌ها شد. طحال موش‌ها تحت شرایط استریل خارج و بعد از قطعه‌قطعه شدن در ۵ml محیط کشت RPMI-1640 (شرکت Sigma -آمریکا) حاوی ۱۰٪ FBS (شرکت Gibco -آلمان) له گردید. بافت حاصل جهت تهیه سوسپانسیون سلولی از توری سیمی به قطر ۰/۲ میلی‌متر عبور داده شد. سلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰g پس از سانتریفیوژ شدند. سپس به‌منظور حذف RBCها، بر روی رسوب سلولی به‌دست‌آمده ۵ml بافر لیز کننده افزوده شد. بعد از ۵ دقیقه ضمن افزودن ۱۰ml محیط کشت بار دیگر به مدت ده دقیقه در ۲۰۰g بار دیگر سانتریفیوژ شد. رسوب سلولی در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰٪FBS به حالت سوسپانسون درآورده شد. به دنبال شمارش سلول‌ها، سوسپانسونی حاوی 10^6cell/ml ×۱ تهیه شد و ۱۰۰ µl از آن در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ته تخت ریخته شد. برای هر نمونه سه تکرار در حضور پیکره کشته‌شده ($4/5\times10^4$ در حجم ۱۰۰ میکرولیتر) و سه تکرار بدون حضور باکتری شده انجام شد. به‌عنوان بلانک نیز در سه چاهک از محیط RPMI خالی استفاده شد. بعد از ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری در انکوباتور حاوی ۵٪ CO_2 به هر چاهک ۲۵µl محلول MTT (۵ mg/ml در PBS) ا افزوده‌شده، به مدت ۴ ساعت دیگر گرمخانه گذاری گردید. در این مدت احیاء ماده MTT توسط سلول‌های زنده و در حال تکثیر سبب تشکیل کریستال‌های فورمازون گردید که با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به حالت

[3]Phosphate-buffered saline

محلول در آمد. سپس شدت رنگ در طول‌موج ۴۹۰nm تعیین و ایندکس تحریک بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید.

$$\text{اندکس تحریک} = \frac{\text{بلانک OD- باکتری OD}}{\text{بلانک OD- درعدم حضور باکتری OD}}$$

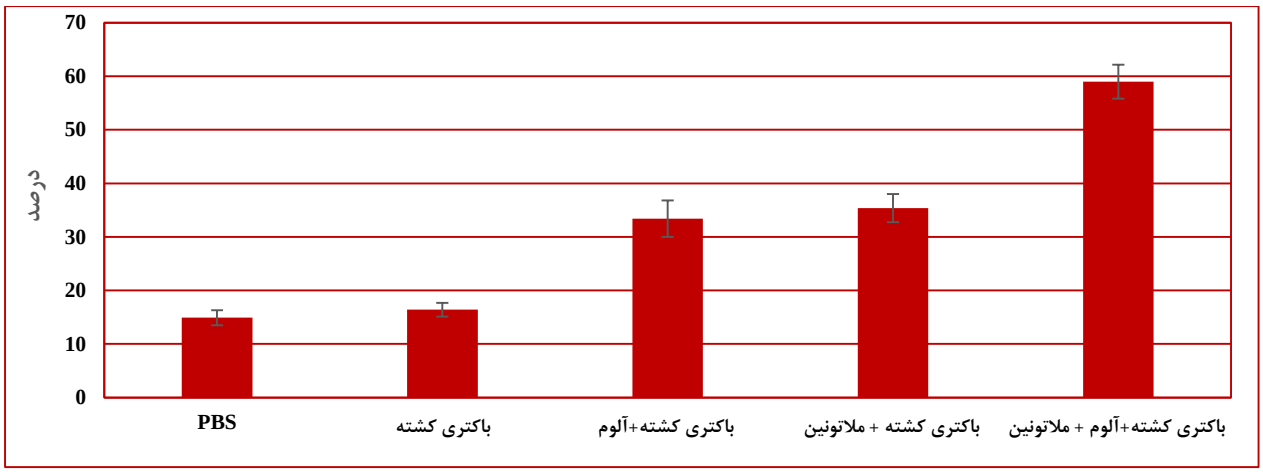
تعیین میزان حفاظت بخشی موش‌ها: این ارزیابی بر روی ۵ موش از هر گروه انجام شد. به این منظور دو هفته بعد از آخرین ایمن‌سازی، 10^7 CFU باکتری زنده به داخل صفاق موش‌ها تزریق شد. موش‌ها به مدت ۳ هفته نگاهداری شده و تلفات آن‌ها ثبت کشت.

روش آماری: جهت رسم منحنی زنده‌مانی از نرم‌افزار Medcalc ویراست ۱۵ و آزمون آماری kaplan-Meier استفاده شد. جهت مقایسه سایر داده‌ها از آنالیز آماری واریانس یک‌طرفه one-way-anova و تست tukey در نرم‌افزار SPSS ویراست ۲۱ استفاده شد. سایر منحنی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft office ویراست ۲۰۱۶ رسم شد. سطح P<۰/۰۵ به‌عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

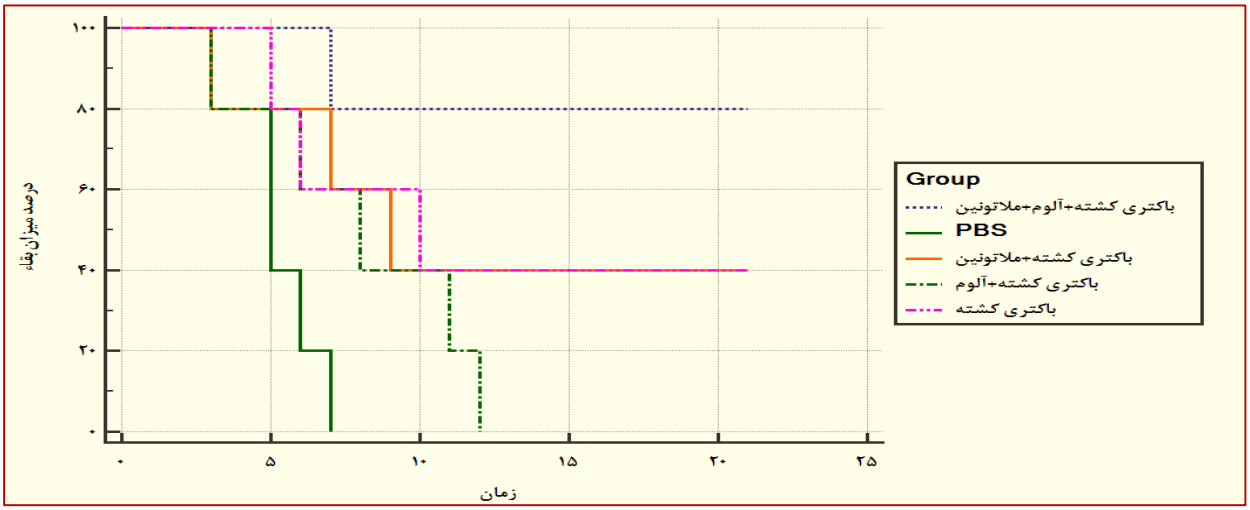
نتایج

ارزیابی میزان بقاء موش‌های واکسینه پس از چالش با سویه زنده *سالمونلاتیفی‌موریوم*:

همان‌طور که انتظار می‌رفت، میزان تلفات در موش‌هایی که واکسن دریافت نکرده بودند، پس از چالش با سویه زنده *سالمونلاتیفی‌موریوم* به‌صورت قابل‌توجهی بالا بود به‌طوری در ظرف یک هفته کلیه این موش‌ها تلف شدند (نمودار ۱). میزان تلفات در گروه دریافت‌کننده واکسن به‌صورت باکتری کشته‌شده نیز بالا بود، به‌طوری‌که کلیه حیوانات این گروه نیز تا روز دوازدهم



نمودار ۱- ارزیابی شدت واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح p<0.001 است.



شکل ۱- ارزیابی میزان بقاء موش‌های واکسینه پس از چالش با سویه زنده *سالمونلاتیفی‌موریوم*.

پس از چالش تلف‌شده بودند (شکل ۱). به نظر نمی‌رسد که بین میزان بقاء دوگروهی که ترکیب ملاتونین و باکتری کشته‌شده یا آلوم و باکتری کشته‌شده را دریافت نمودند اختلاف معناداری وجود داشته باشد. میزان بقاء این در پایان دوره چالش ۲۱ روزه ۲۰٪ بود (نمودار ۱). بر اساس نتایج مشخص است که میزان بقاء موش‌هایی که دریافت‌کننده واکسن ترکیبی بودند، به‌طور قابل‌توجهی نسبت به سایر گروه‌ها بهبود معنی‌داری یافته است، به‌طوری‌که تنها در این گروه، شاهد یک مورد تلفات در روز ۷ بودیم و بدین ترتیب میزان بقا در پایان دوره چالش ۲۱ روزه ۸۰٪ بود (شکل ۱).

ارزیابی واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری:

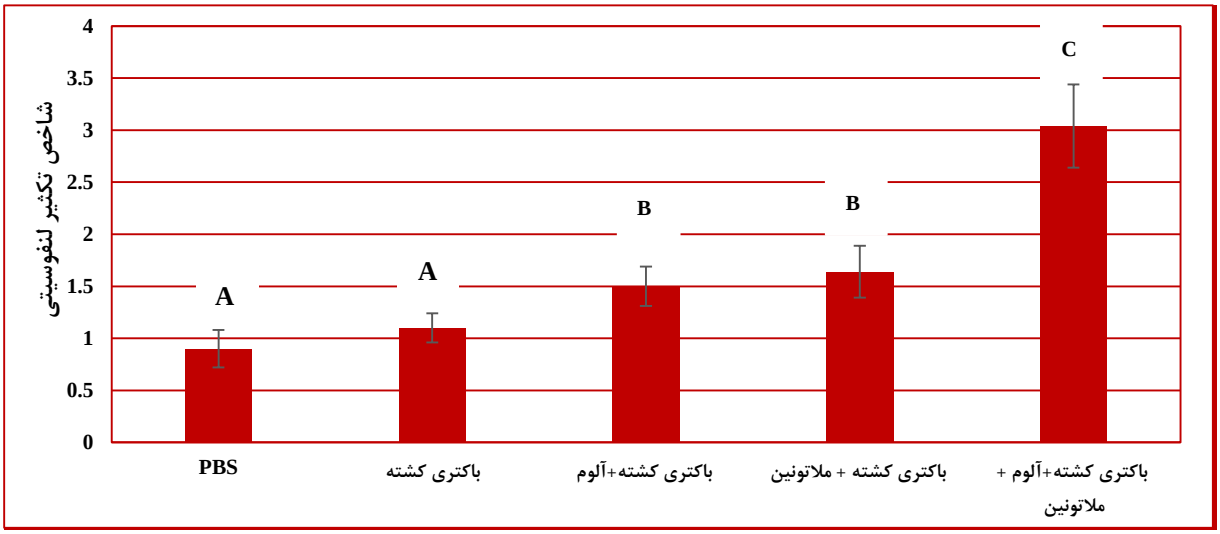
دریافت باکتری کشته‌شده به‌تنهایی توسط موش‌ها موجب افزایش مختصری درشدت واکنش DTH نسبت به گروه دریافت‌کننده PBS به‌تنهایی شد. هرچند که تغییر یادشده ازنظر آماری معنادار نبود (نمودار ۱).

واکنش DTH در دو گروه دریافت‌کننده ترکیب آلوم و باکتری کشته‌شده یا ملاتونین و باکتری کشته‌شده به ترتیب به میزان ۲/۴ و ۲/۳ به‌طور معناداری نسبت به گروه دریافت‌کننده PBS افزایش یافت. بااین‌حال بیشترین افزایش مربوط به گروه دریافت‌کننده واکسن ترکیبی به میزان متوسط ۴ برابر افزایش

جدول ۱- ارزیابی میزان تیتر آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های O و H در گروه‌های واکسینه

تیتر آنتی‌بادی گروه	آنتی‌ژن O	آنتی‌ژن H
PBS	۲۵/۶ ± ۸/۷۶^{A}	۵۱/۲ ± ۱۷/۵۲^{B}
باکتری کشته‌شده	۸۹/۶ ± ۳۵/۰۵^{B}	۱۵۳/۶ ± ۳۵/۲۴^{B}
باکتری کشته‌شده+ آلوم	۳۰۷/۲ ± ۱۱۴/۴۸^{C}	۴۰۹/۶ ± ۱۴۰/۲۱^{B}
باکتری کشته‌شده+ ملاتونین	۲۰۴/۸ ± ۷۰/۱^{D}	۳۰۷/۲ ± ۱۱۴/۴۸۵^{C}
باکتری کشته‌شده+آلوم+ملاتونین	۶۱۴/۴ ± ۱۶۸/۹۷^{E}	۸۱۹/۲ ± ۲۸۰/۴۳^{D}

حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p < ۰/۰۵$ است.



نمودار ۲- ارزیابی شدت تکثیر لنفوسیتی. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p<0.01$ است.

ارزیابی‌های ایمونولوژیک واکسن:

این ارزیابی‌ها بر روی ۵ موش هر گروه پس از دریافت ۲ بار واکسن انجام شد.

یافت (نمودار ۱).

ارزیابی تیتر آنتی‌بادی:

تیتر آنتی‌بادی در این پایان‌نامه به شیوه سرواگلوتیناسیون

ویدال برای آنتی‌ژن‌های O و H به‌صورت مجزا سنجیده شد. همان‌طور که انتظار می‌رفت کمترین میزان تیتر آنتی‌بادی برای هردو آنتی‌ژن O و H مربوط به گروه دریافت‌کننده PBS بود. تیتر آنتی‌بادی ضد آنی ژن O در گروه دریافت‌کننده باکتری کشته‌شده افزایش معناداری را نسبت به گروه دریافت‌کننده PBS نشان داد. بااین‌حال افزایش تیتر آنتی‌ژن H در این گروه نسبت به گروه شاهد معنادار نبود (جدول ۱).

هر دو تیتر مربوط به آنتی‌ژن‌های O و H در دو گروه دریافت‌کننده آلوم و باکتری کشته‌شده یا ملاتونین و باکتری کشته‌شده نسبت به گروه شاهد و یا گروه دریافت‌کننده باکتری کشته‌شده افزایش معناداری یافت (جدول ۱). بااین‌حال تیتر آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن O در گروه باکتری کشته‌شده و آلوم از گروه ملاتونین و باکتری کشته‌شده بیشتر بود (جدول ۱).

بیشترین میزان تغییر آنتی‌بادی که نسبت به سایر گروه‌ها به‌طور معناداری در مورد آنتی‌ژن‌های O و H افزایش‌یافته بود، مربوط به گروه دریافت‌کننده واکسن ترکیبی بود به‌طوری‌که تیتر آنتی‌بادی O به میزان ۲۸٪ و تیتر آنتی‌بادی در رابطه با آنتی‌ژن H به میزان ۴۵٪ نسبت به گروهی که تنها واکسن کشته‌شده را دریافت نموده بود افزایش یافت (جدول ۱).

ارزیابی میزان تکثیر لنفوسیتی:

تست احیاء MTT که در این مطالعه از آن استفاده شد به‌عنوان شاخص قابلیت تکثیر لنفوسیت‌ها کاربرد دارد. ماده MTT پس از برداشت توسط لنفوسیت‌ها در اثر فعالیت میتوکندریایی تبدیل به کریستال‌های آبی‌رنگ فورمازون می‌شود که با افزودن DMSO کریستال‌ها حل‌شده و توسط اسپکتوفتومتر سنجیده می‌شود. طبیعی است که پس از گذشت ۷۲ ساعت هرچقدر تعداد سلول‌های تکثیر یافته بیشتر باشد؛ میزان تبدیل MTT به فورمازون نیز بیشتر خواهد بود. براین اساس کمترین میزان پاسخ تکثیر لنفوسیت‌ها در گروه دریافت‌کننده PBS مشاهده شد (نمودار ۲). دریافت باکتری کشته‌شده در موش‌ها توانست به میزان محدودی تکثیر لنفوسیتی را نسبت به گروه دریافت‌کننده PBS افزایش دهد، هرچند که تغییر یادشده معنادار نبود (نمودار ۲). دو گروه دریافت‌کننده آلوم و باکتری کشته‌شده یا ملاتونین و باکتری کشته‌شده افزایش تکثیر لنفوسیتی به ترتیب در حدود ۱/۷ و ۱/۸ برابری نسبت به گروه دریافت‌کننده PBS نشان دادند که تغییرات یادشده نسبت به هر دو گروه دریافت‌کننده PBS یا باکتری کشته‌شده معنادار بود (نمودار ۲). در گروه دریافت‌کننده واکسن ترکیبی قابلیت تکثیر لنفوسیت‌ها به نحو قابل‌توجهی افزایش یافت. به‌طوری‌که نسبت به گروه دریافت‌کننده PBS افزایش ۳/۴ برابری نشان داد که حاکی از گسترش قابل‌توجه لنفوسیت‌های اجرایی در این گروه است (نمودار ۲).

بحث

بر اساس نتایج این مطالعه به نظر می‌رسد که با توجه به ماهیت درون‌سلولی سالمونلاها، استفاده از ملاتونین به‌عنوان یکی از معروف‌ترین ترکیبات نرواندوکراین در همراهی با ادجوانت آلوم، موجب افزایش قابل‌توجه ایمنی‌زایی و اثرات حفاظتی واکسن کشته‌شده *سالمونلا تیفی موریوم* شده است. تأثیر عوامل مؤثر بر مسیرهای نوروایمونوکراین در جهت‌گیری پاسخ‌های ایمنی، در برخی از مطالعات گذشته نشان داده‌شده است. به‌طور مثال در مطالعه‌ای که توسط حسینی جزنی و همکاران صورت گرفت اثر ترکیب آلوم-نالوکسان (آنت آگونیست اپیوئیدی) به‌عنوان ادجوانت در تحریک مؤثر پاسخ ایمنی سلولار و هومورال در پاسخ به *سالمونلا تیفی موریوم* نشان داده‌شده است. بر این اساس ترکیب آلوم-نالوکسان منجر به تقویت تکثیر پاسخ اختصاصی لنفوسیت‌ها به همراه پلاریزه کرده پاسخ‌ها به سمت Th1 و افزایش تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی سالمونلا شده است (۲). همچنین در مطالعه دیگری اثر ترکیب آلوم-پروپرانول (یک آنتاگونیست گیرنده بتا-آدرنرژیک) به‌عنوان ادجوانت جدید در تحریک پاسخ ایمنی سلولی و هومورال به جسم سلولی کشته‌شده *سالمونلا تیفی موریوم* (HKST) به‌عنوان یک مدل واکسن بررسی‌شده است (۴). سمیه حسنی و همکاران، از مخلوط آلوم-ICI 118,551 به‌عنوان ادجوانت در القاء پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولار نسبت به جسم سلولی کشته‌شده *سالمونلا تیفی موریوم* به‌عنوان واکسن استفاده کردند و نتایج مثبتی گرفتند (۱۳). در هر دو مورد گروه ترکیبی پاسخ‌های ایمنی بهتری را بلاخص ازنظر ایجاد پاسخ‌های ایمنی سلولی و اثرات محافظت بخش به دنبال چالش با شکل زنده باکتری نشان داده‌شده است (۴ و ۱۰).

ماهیت چربی‌دوست ملاتونین این امکان را به هورمون می‌دهد که وارد بسیاری از سلول‌ها و غلظت بالایی را در موضع ایجاد کند. این هورمون همچنین توانایی عبور از سدهای فیزیولوژیکی را دارد (۱۴). در رابطه با نقش ملاتونین در سیستم ایمنی بدن این نکته حائز اهمیت است که در برخی شرایط مثل برداشتن

غده پینه آل، مهار تولید و ترشح ملاتونین در شرایطی مثل قطع عصب رسانی غده و یا قرارگیری در روشنایی مداوم، باعث سرکوب ایمنی در دو بخش سلولی و هومورال می‌شود (۱۷-۱۵). درزمینه استفاده از ملاتونین به‌عنوان ادجوانت در ساخت واکسن تجربیات خاصی وجود ندارد. بااین‌حال در مطالعات پیشین نشان داده‌شده است که تجویز زیرپوستی ملاتونین به حیوانات واکسینه شده علیه عامل گندیدگی سم موجبات افزایش تیر اختصاصی آنتی‌بادی علیه باکتری *Dichelobacter nodosus* شده است (۱۰). همچنین افزایش موفقیت واکسیناسیون علیه انگل شیستوزوما مانسونی به دنبال تجویز چندروزه ملاتونین پس از تزریق واکسن ساخته‌شده با آنتی‌ژن‌های انگلی در هامستر گزارش‌شده است (۱۰ و ۱۱).

درگذشته نشان داده‌شده است که تقویت پاسخ‌های ایمنی سلولی توسط ملاتونین ارتباط تنگاتنگی با آزاد شدن IL-2 دارد. چراکه جلوگیری از سنتز ملاتونین باعث کاهش در تولید و بیان گیرنده‌ی IL-2 است که با تجویز ملاتونین هم تولید IL-2 و هم بیان IL-2R افزایش می‌یابد. این یافته‌ها نشان می‌دهند علاوه بر غده‌ی پینه آل، سلول‌های لنفوئیدی یکی دیگر از منابع مهم تولید ملاتونین هستند و این ملاتونین می‌تواند در تنظیم سیستم ایمنی دخالت داشته باشد (۱۸، ۱۹). در همین راستا نتایج ما نیز به‌خوبی نشان دادند که استفاده از ملاتونین در زمان شکل‌گیری پاسخ‌های ایمنی، توانسته است که منجر به پاسخ‌های ایمنی سلولی قوی‌تری و ایجاد ازدیاد حساسیت تأخیری بیشتری گردد. در پاسخ‌های ایمنی سلولی علیه باکتری‌های داخل سلولی، در پاسخ به شناسایی میکروب درون‌سلولی، ماکروفاژها اقدام به تولید IL-12 می‌نمایند. در این شرایط لنفوسیت‌های Th از طریق تولید اینترفرون گاما موجب تقویت سازوکاری ضد میکروبی ماکروفاژها می‌گردند که نمود آن را می‌توان در پاسخ‌های ازدیاد حساسیت تأخیری یافت (۲۰). به‌خوبی نشان داده‌شده است که ملاتونین موجب تحریک تولید IL2 از لنفوسیت‌های T هم‌زمان با تحریک تولید IL12 از سلول‌های دندریتیک می‌گردد. در همین راستا پیشنهادشده که افزودن ملاتونین به‌صورت یک مکمل ممکن است که موجب پیشبرد تولید IL2 و IL12 و درنهایت تقویت پاسخ‌های Th1 شود (۲۱). همچنین ثابت‌شده است که ملاتونین موجب کاهش تولید سایتوکاین ضدالتهابی IL10 هم‌زمان با کاهش تولید IL4 (سایتوکاین پلاریزه کننده Th2) در محیط کشت می‌گردد (۲۲). به‌علاوه، در رابطه با پاسخ‌های سایتوکاینی، ملاتونین باعث تحریک تولید اینترفرون گاما توسط لنفوسیت‌های Th1 می‌شود (۲۳، ۲۴).

در منابع مختلف ذکرشده است که تجویز ملاتونین فعالیت غدد لنفاوی، طحال و سلول‌های مغز استخوان (۲۱، ۲۲) و عملکرد ایمنی ذاتی و اکتسابی را افزایش می‌دهد (۲۳، ۲۴). در همین راستا نشان داد شده است که ملاتونین باعث بازگرداندن فعالیت سلول‌های T کمکی معیوب در موش‌هایی که سیستم ایمنی آن‌ها سرکوب‌شده بود شده است (۱۷). نقش تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی و آنتی‌آپوپتوزی ملاتونین عمدتاً با اثراتی که روی تیموس، T سل، NK سل، منوسیت و لکوسیت-های ائوزینوفیل دارد مشخص می‌شود (۸). به نحو جالب‌توجهی نشان داده‌شده است که تجویز ملاتونین اگزوژنوس باعث تزاید لنفوسیت‌های T و افزایش ارائه آنتی‌ژن توسط ماکروفاژها برای سلول‌های T کمکی به‌وسیله افزایش بیان مولکول‌های MHCII می‌شود (۲۵). افزودن ملاتونین به رژیم غذایی موش‌ها منجر به افزایش تعداد کلی لنفوسیت‌های خون همراه با افزایش قابلیت تکثیری آن‌ها در پاسخ به میتوژن شده است (۲۶). در همین راستا افزایش قابل‌توجه شدت تکثیر اختصاصی به سالمونلا را ما در گروه دریافت‌کننده آلوم و ملاتونین مشاهده نمودیم.

بر اساس مهم‌ترین نتیجه‌ای که در این تحقیق به‌دست‌آمده به نظر می‌رسد که ترکیب ملاتونین با آلوم منجر به تقویت قابلیت‌های آلوم به‌ویژه در ایجاد پاسخ‌های مناسب‌تر سلولی گردد. گرچه آلوم تنها ادجوانت مجاز برای استفاده در واکسن‌های انسانی است و امروزه در بسیاری از واکسن‌ها به‌طور وسیع و موفقیت‌آمیزی استفاده‌شده است اما مهم‌ترین محدودیت ادجوانت آلوم عدم توانایی آن در ایجاد پاسخ‌های ایمنی سلولی است و باعث شیفت پاسخ ایمنی به سمت Th2 و تقویت ایمنی هومورال می‌گردد، بنابراین ادجوانت مناسبی برای تحریک سیستم ایمنی علیه پاتوژن‌هایی که ایمنی مؤثر علیه آن‌ها پاسخ‌های Th1 و ایمنی سلولی است نیست (۲۷).

طبیعی است که دفاع مؤثر و کارآمد علیه یک باکتری داخل سلولی از قبیل *سالمونلا* نیازمند همکاری مؤثر سلول‌های Th1 و ماکروفاژها و دندریتیک است. نتایج منحنی بقاء به‌خوبی نشان داد که پس از دو بار دریافت واکسن کشته‌شده *سالمونلاتیفی موریوم* در همراهی با ترکیب ادجوانت آلوم و ملاتونین منجر به بقاء مؤثرتر حیوانات به میزان ۸۰٪ پس از چالش با باکتری زنده *سالمونلاتیفی‌موریوم* می‌شود. ارزیابی‌های ایمونولوژیک نیز در این

شرایط نشان داد که حیواناتی که واکسن ترکیبی دریافت نمودند به‌طور قابل‌توجهی افزایش سطح آنتی‌بادی، پاسخ‌های ازدیاد حساسیت تأخیری (که نمودی از عملکرد لنفوسیت‌های Th1 و ماکروفاژها است) و پاسخ‌های بلاستوژنیک لنفوسیت‌های T به میتوژن را نشان دادند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد استفاده از ملاتونین به‌عنوان یک ادجوانت تقریباً به‌اندازه ادجوانت استاندارد و تأییدشده آلوم توانسته است که موجب افزایش بقاء موش‌ها پس از چالش با باکتری زنده *سالمونلاتیفی موریوم* شود. مؤلفه‌های ایمونولوژیک از قبیل شدت پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری، تیتر آنتی‌بادی، قابلیت پاسخ تکثیری لنفوسیت‌ها و تولید آنتی‌بادی نیز تقریباً بین دو گروه دریافت‌کننده آلوم و ملاتونین به‌عنوان ادجوانت در همراهی با باکتری کشته‌شده *سالمونلاتیفی موریوم* مشابه بود؛ بنابراین به نظر می‌رسد که ملاتونین به‌عنوان یک ترکیب ایمن قادر به ایجاد پاسخ‌های ایمنی همپای ادجوانت آلوم است.

با توجه به اینکه مشخص‌شده است که ادجوانت آلوم از طریق اثرات دپویی خود با افزایش نگهداشت آنتی‌ژن موجب افزایش زمان بقاء آنتی‌ژن جهت ایجاد پاسخ‌های ایمنی می‌شود. همچنین به‌عنوان یک تخریب‌گر ملایم موجب ایجاد آسیب بافتی محدودشده و بدین ترتیب از طریق تولید الگوهای مولکولی مرتبط با آسیب (DAMP) موجب بروز مولکول‌های کمک تحریکی و راه‌اندازی پاسخ‌های ایمنی می‌شود. از طرفی عمده اثرات ملاتونین از طریق تأثیرگذاری بر روی گیرنده‌های سطح سلولی بوده و منجر بـه تحریک سلول‌هـای عرضه‌کننده آنتی‌ژن جهت تولید پاسخ‌های Th1 از طریق تقویت بروز مولکول‌های کمک تحریکی مولکول‌های MHC و به‌خصوص سایتوکاین پیش التهابی IL12 در زمان عرضه آنتی‌ژن است (۲۸).

نتیجه‌گیری

از مجموعه مطالب فوق و همچنین نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق اهمیت ملاتونین در تقویت پاسخ ایمنی در تنظیم پاسخ‌های ایمنی مشخص به نظر می‌رسد؛ بنابراین ممکن است که افزودن ماده ملاتونین به ادجوانت آلوم به‌عنوان یک راهکار مناسب جهت تقویت پاسخ‌های ادجوانتی آلوم به‌خصوص در جهت تولید واکسن‌های کارآمد برای عفونت‌های داخل سلولی یا آنتی‌ژن توموری منجر گردد. به‌هرحال در مطالعه حاضر یک مطالعه مقدماتی بوده و لازم است که در آینده مطالعات بیشتری با استفاده از آنتی‌ژن‌های دیگر نیز صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه خانم زهرا جوادی در مقطع کارشناسی ارشد باکتری‌شناسی (به شماره پایان‌نامه ۴۳۶/تد.ت/۳) دانشگاه ارومیه بوده که با حمایت مادی معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه بوده انجام‌شده است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده‌اند.

References

1. Allison AC, Byars NE. Immunological adjuvants: desirable properties and side-effects. Molecular immunology. 1991;28(3):279-84.
2. Jazani NH, Parsania S, Sohrabpour M, Mazloomi E, Karimzad M, Shahabi S. Naloxone and alum synergistically augment adjuvant activities of each other in a mouse vaccine model of Salmonella typhimurium infection. Immunobiology. 2011;216(6):744-51.
3. Gupta RK, Siber GR. Adjuvants for human vaccines—current status, problems and future prospects. Vaccine. 1995;13(14):1263-76.
4. Mazloomi E, Jazani NH, Shahabi S. A novel adjuvant, mixture of alum and the beta-adrenergic receptor antagonist propranolol, elicits both humoral and cellular immune responses for heat-killed Salmonella typhimurium vaccine. Vaccine. 2012;30(16):2640-6.

5. Hardeland R, Poeggeler B. Non-vertebrate melatonin. Journal of pineal research. 2003;34(4):233-41.
6. Canyilmaz E, Uslu GH, Bahat Z, Kandaz M, Mungan S, Haciislamoglu E, et al. Comparison of the effects of melatonin and genistein on radiation-induced nephrotoxicity: Results of an experimental study. Biomedical Reports. 2016;4(1):45-50.
7. Reiter RJ, Tan D-x, Manchester LC, Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. Cell biochemistry and biophysics. 2001;34(2): 237-56.
8. Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni GJ. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. Journal of pineal research. 2000;28(4):193-202.
9. Thorpe LE, Frieden TR, Laserson KF, Wells C, Khatri GR. Seasonality of tuberculosis in India: is it real and what does it tell us? The Lancet. 2004;364(9445):1613-4.
10. Kotb Elmahallawy E, Ortega Luque J, Saleh Aloweidi A, Gutierrez-Fernandez J, Sampedro-Martinez A, Rodriguez-Granger J, et al. Potential relevance of melatonin against some infectious agents: A Review and Assessment of Recent Research. Current medicinal chemistry. 2015;22(33):3848-61.
11. Ozkan E, Yaman H, Cakir E, Deniz O, Oztosun M, Gumus S, et al. Plasma melatonin and urinary 6-hydroxymelatonin levels in patients with pulmonary tuberculosis. Inflammation. 2012;35(4):1429-34.
12. Jahangiri S, Abtahi Froushani SM, Delirzh N. Combination immunotherapy with extract of heated 4T1 and naloxone in mouse model of breast cancer. Turk J Med Sci. 2016 17;46(2):518-23.
13. Hasani S, Hosseini Jazani N, Shahabi S, Karamati S A. Evaluation of the effects of ICI118, 551, a beta adreno-receptor antagonist and alum,as adjuvant for increasing THE protection of vaccination against Salmonella typhimurium. J Urmia Univ Med Sci. 2014; 24 (11):851-861[In Persian].
14. Shirazi A, Ghobadi G, Ghazi-Khansari M. A radiobiological review on melatonin: a novel radioprotector. Journal of radiation research. 2007;48(4):263-72.
15. Skwarlo-Sonta K. Melatonin in immunity: comparative aspects. Neuro endocrinology letters. 2002;23:61-6.
16. Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-immune system relationships. Current topics in medicinal chemistry. 2002;2(2):167-79.
17. Maestroni GJ, Zammaretti F, Pedrinis E. Hematopoietic effect of melatonin involvement of type 1 K-opioid receptor on bone marrow macrophages and interleukin. Journal of pineal research. 1999;27(3):145-53.
18. Carrillo-Vico A, Calvo JR, Abreu P, Lardone PJ, GARCÍA S, Reiter RJ, et al. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. The FASEB Journal. 2004;18(3):537-9.
19. Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Fernández-Santos JM, Martín-Lacave Is, Calvo JR, Karasek M, et al. Human lymphocyte-synthesized melatonin is involved in the regulation of the interleukin-2/interleukin-2 receptor system. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2005;90(2):992-1000.
20. Abtahi Froushani SM, Galeh HE. New insight into the immunomodulatory mechanisms of Tretinoin in NMRI mice. Iranian journal of basic medical sciences. 2014;17(9):632-7.
21. Esteban-Zubero E, López-Pingarrón L, Alatorre-Jiménez MA, Ochoa-Moneo P, Buisac-Ramón C, Rivas-Jiménez M, et al. Melatonin's role as a co-adjuvant treatment in colonic diseases: A review. Life Sciences. 2016;17 (1): 72-81
22. Najafi M, Shirazi A, Motevaseli E, Geraily G, Norouzi F, Heidari M, et al. The melatonin immunomodulatory actions in radiotherapy. Biophysical reviews. 2017;9(2):1-10.
23. García-Mauriño S, Pozo D, Carrillo-Vico A, Calvo JR, Guerrero JM. Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. Life sciences. 1999;65(20):2143-50.
24. Liu F, Ng T, Fung M. Pineal indoles stimulate the gene expression of immunomodulating cytokines. Journal of neural transmission. 2001;108(4):397-405.
25. Andersen L. The analgesic effects of exogenous melatonin in humans. Acta Anaesthesiologica Scandinavica. 2016;60(7):1024-5.
26. Haldar C, Rai S, Singh R. Melatonin blocks dexamethasone-induced immunosuppression in a seasonally breeding rodent Indian palm squirrel, Funambulus pennanti. Steroids. 2004;69(6):367-77.

27. Grebe KM, Hickman HD, Irvine KR, Takeda K, Bennink JR, Yewdell JW. Sympathetic nervous system control of anti-influenza CD8+ T cell responses. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009;106(13):5300-5.

28. Gupta S, Haldar C. Physiological crosstalk between melatonin and glucocorticoid receptor modulates T-cell mediated immune responses in a wild tropical rodent, Funambulus pennanti. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology. 2013;134:23-36.

Original Article

Effects of the Combined Alum and Melatonin on Immune Responses in NMRI Mice Immunized with the Killed Preparation of *Salmonella Typhimurium*

Javadi Z, Abtahi Froushani SM*, Ahmadi M

Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 05 Aug 2020 Accepted: 15 Nov 2020

Abstract

Background & Objective: Melatonin is one of the immuno-modulator compounds. The purpose of this study was to determine the feasibility of improving immune responses following the use of melatonin in a vaccine made from the killed form of *Salmonella typhimurium* and alum.

Materials & Methods: This experimental study consists of 50 male NMRI mice that were allocated in 5 equal groups, randomly. Each mouse in different groups was subcutaneously treated with killed preparations of bacteria (10^6 CFU), killed preparations of bacteria with alum, killed preparation bacteria with melatonin (100mg/kg), combined melatonin and alum with killed preparation bacteria, and finally PBS at two-week intervals. One week after the last immunization, one-half of the mice were euthanized and used for immunological evaluations. Other mice in each group were challenged intraperitoneally with the 10^7CFU live preparation of *S.typhimurium* in order to evaluate the protective efficacy of vaccine protocols.

Results: Combined vaccine caused a more favorable survival curve concurrent with a significant increase in the delayed-type hypersensitivity immune response and lymphocyte proliferation after challenging with bacterial antigen compared to other groups ($P<0.05$). The antibody titers against O and H antigens in the Widal test showed an increase in the alum group more than the melatonin group. The antibody titers showed an increase in the combined group. Nevertheless, this change did not show any significant effect in comparison with the alum group.

Conclusion: Combined melatonin and alum caused a significant increase in immunogenicity and protective effects against the killed preparation of *S. typhimurium.*

Keywords: *Salmonella typhimurium,* Vaccine, adjuvant, Alum, Melatonin

***Corresponding Author: Abtahi Froushani Seyyed Meysam**, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
Email: sm.abtahi@urmia.ac.ir
https://orcid.org/0000-0003-2579-6618